



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **109477**

(13) **C2**

(51) МПК

A61B 5/145 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

G01N 33/561 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

- (21) Номер заявки: **а 2013 11214**
(22) Дата подання заявки: **20.09.2013**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.08.2015**
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.03.2015, Бюл.№ 6**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.08.2015, Бюл.№ 16**

- (72) Винахідник(и):
**Маслак Ганна Сергіївна (UA),
Машейко Іван Володимирович (UA),
Стекленьова Наталія Іванівна (UA),
Костюк Ольга Володимирівна (UA),
Шевцова Алла Іванівна (UA),
Бразалук Олександр Захарович (UA)**
- (73) Власник(и):
**ДЕРЖАВНИЙ ЗАКЛАД
"ДНІПРОПЕТРОВСЬКА МЕДИЧНА
АКАДЕМІЯ",
вул. Дзержинського, 9, м. Дніпропетровськ,
49044 (UA)**
- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Машейко І.В. Діагностична цінність визначення концентрації та фукозилізованості Альфа-1-кислого глікопротеїну при хронічних мієлолейкозах / І.В. Машейко, О.З. Бразалук // Медичні перспективи. – 2010. – Т.15. - №3. – С. 1-5
Стекленьова Н.І. Мікрогетерогенність ?-кислого глікопротеїду при онкологічних захворюваннях та запальних процесах / Н.І. Стекленьова, Т.П. Ніколаєнко, А.І. Шевцова // Онкологія. – 2007. – Т. 9. - №2. – С. 101-104

(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ТРАНСФОРМАЦІЇ ІСТИННОЇ ПОЛІЦИТЕМІЇ У СУБЛЕЙКЕМІЧНИЙ МІЄЛОЗ

(57) Реферат:

Винахід належить до галузі медицини, а саме до гематології і може використовуватись для ранньої діагностики переходу істинної поліцитемії у сублейкемічний мієлоз у онкогематологічних хворих. Спосіб діагностики полягає у проведенні перехресного імуноелектрофорезу проти лектину, а потім проти моноспецифічних поліклональних антитіл до α_1 -кислого глікопротеїну, причому при збільшенні фракції α_1 -кислого глікопротеїну, що не містить біантенних N-гліканів більше 50 % діагностують сублейкемічний мієлоз.

UA 109477 C2

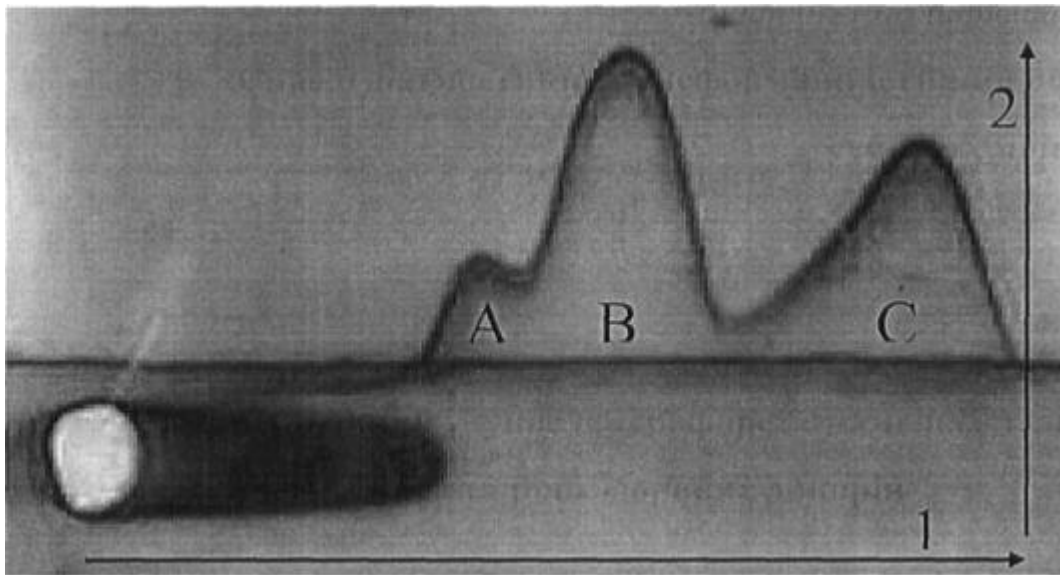


Fig. 1

Винахід належить до галузі медицини, а саме до гематології і може використовуватись для ранньої діагностики переходу істинної поліцитемії у сублейкемічний мієлоз у онкогематологічних хворих, що дає можливість виявити патологічні зміни на ранніх етапах, провести успішне лікування і збільшити контингент вилікованих хворих, які на пізніх етапах діагностики вважаються невиліковними.

Актуальність ранньої діагностики переходу істинної поліцитемії у сублейкемічний мієлоз у онкогематологічних хворих зумовлена складністю діагностики і несвоєчасним виявленням, неефективністю лікування через значне розповсюдження процесу, що призводить до загибелі таких хворих у період від 6 до 24 місяців. Вчасно отримані клінічні дані, щодо погіршення стану хворих з хронічними мієлолейкозами дозволяють застосовувати оптимальні лікувальні алгоритми, ефект від яких визначається поліпшенням соматичного статусу онкогематологічних хворих.

Як свідчить клінічний досвід, трансформація хронічних мієлолейкозів у більш агресивні форми захворювання відбувається непомітно і тривалий час протікає в субклінічній формі. В цей період хворі не відчують дискомфорту і не пред'являють скарг при диспансерному огляді лікарем, а проведені стандартні біохімічні та морфологічні дослідження не виявляють патологічних змін у біологічних рідинах пацієнтів. Додаткові методи досліджень (пункція, біопсія тощо), призначаються тоді, коли з'являються відповідні скарги або мають місце об'єктивні зміни стану хворого. Однак, невчасно діагностований сублейкемічний мієлоз зменшує шанси на проведення ефективного лікування. Тому розробка способів ранньої діагностики трансформації хронічних мієлолейкозів у більш агресивні форми у онкогематологічних хворих є необхідним заходом, оскільки дає можливість вчасно виявляти і проводити ефективне лікування даної патології.

З метою діагностування сублейкемічного мієлозу застосовують комплекс лабораторно-клінічних засобів, який включає імунологічні, біохімічні, гістологічні, ультразвукове та радіоізотопне дослідження.

Відомий спосіб диференціальної діагностики істинної поліцитемії та сублейкемічного мієлозу [1]. Спосіб полягає в наступному: у хворого проводять забір периферичної крові, готують мазки, фіксують, наносять інкубаційний буфер і встановлюють активність мієлопероксидази, НАД-оксидази та вміст катіонних білків. На основі отриманих даних розраховують загальну цитохімічну активність сегментоядерних нейтрофілів. Сублейкемічний мієлоз діагностується при значеннях нижче за 10,3. Істотними недоліками даного способу є: оцінка ферментної активності нейтрофілів за даними мікроскопування, що негативно відбивається на точності та відтворюваності даного аналізу. Для приготування якісних мазків потрібно відбирати значний об'єм крові та одночасно аналізувати декілька зразків, що робить цей метод доволі трудомістким.

Відомий спосіб диференціальної діагностики еритроцитемічної стадії сублейкемічного мієлозу і еритремії [2]. Спосіб полягає в наступному: у хворого беруть венозну кров, гепаринізують, центрифугують, інкубують при 37 °С впродовж 30-40 хвилин з додаванням фосфатного буферу, охолоджують до кімнатної температури, готують мазки і підраховують кількість формазан-позитивних нейтрофілів, враховуючи інтенсивність їх забарвлення в балах з подальшим розрахунком середнього гістохімічного коефіцієнту.

Цей спосіб передбачає оцінку інтегральної тетразолієвої активності та визначення кількості сегментоядерних нейтрофілів. Однак, хронічні мієлолейкози, за допомогою гістологічних досліджень, діагностуються на пізніх стадіях, що є істотним недоліком даного способу. Слід також зазначити, що обробку результатів цитохімічної нітрозолій-відновної реакції проводять вручну - присвоюючи кожному пофарбованому нейтрофілу від одного до чотирьох балів (залежно від інтенсивності забарвлення), що додає суб'єктивізму в процес обробки даних.

Відомий спосіб діагностики хронічних мієлопроліферативних захворювань [3]. Спосіб полягає в наступному: у хворого беруть 20 мл венозної периферичної крові, гепаринізують, змішують з фіколом (Ficoll gradient, Germany), центрифугують, відбирають фракцію моноклеарних клітин; отримують трепанати костного мозку, які фіксують у 0,1 М калій-ацетатному буфері з 0,5 % глутарового діальдегіду та 1,1 % формальдегіду впродовж 18 годин, декальцінують у розчині етилендіамінтетраоцтової кислоти (pH=7,5) від 48 до 72 годин. З отриманого біологічного матеріалу виділяють РНК, на матриці якої синтезують ДНК за стандартним протоколом виробника (Invitrogen, Germany). У отриманих пробах визначають кількість химерних BCR-ABL транскриптів методом полімеразної ланцюгової реакції. BCR-ABL - аномальний ген, що утворюється при транслокації між 9-ою та 22-ою парами хромосом, за норми транскрипти цього гену відсутні. За концентрацією транскриптів гену BCR-ABL встановлюють стадію хронічного мієлолейкозу та оцінюють ризик розвитку бластного кризу.

Даний спосіб має декілька недоліків. По-перше, транскрипти аномального BCR-ABL гену можуть визначатись при різних типах мієлопроліферативних захворювань, що унеможливорює проведення диференційної діагностики. По-друге не можливо приготувати ідентичні за ступенем екстрагування РНК-транскриптів зразки з різних трепанатів, що обумовлює значну похибку у підрахунку концентрації химерних транскриптів гену BCR-ABL. По-третє для проведення цього способу необхідне коштовне устаткування та реактиви.

Відомий спосіб диференційної діагностики сублейкемічного мієлозу (мієлофіброз костного мозку) та хронічного мієлоїдного лейкозу [4]. Спосіб полягає у визначенні і порівнянні декількох біохімічних показників: активності пролідази плазми крові (за Myara et al) [5, 6], концентрації остеокальцину, гідроксипроліну (за Kivirikko) [7], N-кінцевого пептиду проколагену III типу, проколагену I типу, C-кінцевих тілопептидів колагену I типу у сироватці крові та сечі. Розвиток мієлофіброзу кісткового мозку встановлюють при: зниженні активності пролідази плазми крові, зниженні концентрації остеокальцину та гідроксипроліну, та напроти, підвищенню концентрації N-кінцевого пептиду проколагену III типу, проколагену I типу, C-кінцевих тілопептидів колагену I типу у сироватці крові та сечі.

Основним недоліком даного способу є неспецифічність вибраних маркерів, за якими можна встановити порушення тільки збоку кісткової тканини. Тому є необхідність долучати для визначення стадії розвитку та клінічної форми хронічного мієлолейкозу додаткові критерії. Жоден з маркерів прямо не свідчить про зміну морфології клітин крові і не може бути використаний у якості основного критерію для диференційної діагностики онкогематологічних захворювань.

В основу винаходу, що заявляється, поставлено задачу розробки додаткових критеріїв для підвищення точності ранньої діагностики трансформації істинної поліцитемії у сублейкемічний мієлоз у онкогематологічних хворих методом перехресного афінного імуоелектрофорезу зразків плазми крові проти лектину Канавалії мечовидної (*Canavalia ensiformis*, ConA) та моноспецифічних поліклональних антитіл до α_1 -кислого глікопротеїну (АГП), для отримання даних, за якими визначають характер патологічного процесу, раннє встановлення якого дозволяє застосувати ефективне лікування.

Поставлена задача вирішується шляхом оцінки співвідношення глікоформ α_1 -кислого глікопротеїну плазми крові за ступенем зв'язування його фракцій з лектином ConA.

Цей спосіб включає приготування агарозного гелю, внесення зразків плазми крові до лунок, з подальшим проведенням перехресного афінного імуоелектрофорезу у двох взаємоперпендикулярних напрямках: спочатку вносять зразки плазми у розведенні 1:50 і проводять імуоелектрофорез (10 В/см², 1 година) проти лектину ConA, а потім проти моноспецифічних поліклональних антитіл до АГП (2 В/см², 10 годин), для фарбування використовують кумасі синій, на отриманих фореграмах вимірюють площу піків і за цими даними розраховують співвідношення глікоформ α_1 -кислого глікопротеїну плазми крові за ступенем зв'язування з лектином ConA.

Лектин Канавами мечовидної (*Canavalia ensiformis*, ConA) має спорідненість до біантенних N-гліканів [8] у складі α_1 -кислого глікопротеїну, який в свою чергу має п'ять сайтів глікозилування [9]. За норми на фореграми виявлено три піки α_1 -кислого глікопротеїну з різною кількістю біантенних N-гліканів: перша фракція (А) містить тільки біантенні N-глікани і складає 8-8,5 %, друга фракція (В) містить невелику кількість біантенних N-гліканів і складає 48-50 %, третя фракція (С) не містить двоантенних N-гліканів і складає 42-43 % (Фіг.1).

Між сукупністю основних ознак способу, що пропонується, і технічним результатом, який може бути досягнутий, виявляється наступний причинно-наслідковий зв'язок: використання лектину Канавалії мечовидної на першому етапі дозволяє безпосередньо вносити до лунок у агарозному гелі досліджувану плазму у підбраному робочому розведенні, що значно спрощує підготовку зразків до аналізу та дозволяє розділити фракції α_1 -кислого глікопротеїну крові за спорідненістю до лектину ConA; проведення на другому етапі електрофорезу проти моноспецифічних поліклональних антитіл до α_1 -кислого глікопротеїну дозволяє отримати преципітаційні піки, що є найбільш оптимальним для виявлення вірогідної різниці в співвідношенні глікоформ α_1 -кислого глікопротеїну за ступенем розгалуженості N-гліканів.

Спосіб полягає в наступному.

Готують 2 % розчин агарози на 0,1 М трис-вероналовому буфері (рН=8,6) з іонною силою 0,02, доводять його на водяній бані до температури 38 °С і додають розчин лектину Канавалії мечовидної (1 г/л) із розрахунку 0,05 мл на 1 мл розчину агарози і виливають на скляну пластинку 9 × 15 см у такому об'ємі, щоб товщина шару застиглого гелю складала 0,15 см. Потім прорізають лунки 5 мм у діаметрі, у які вносять зразки плазми (розведення 1:50) і проводять імуоелектрофорез (10 В/см²) впродовж 1 години. Після цього розрізають гель на

смужки 3 × 9 см і переносять на інше скло, відступив від краю 3 см. З одного боку смужку гелю приливають 2 % розчином ага рози (для розміщення електродів), з іншого боку наносять робочий гель, який містить моноспецифічні поліклональні антитіла до α_1 -кислого глікопротеїну із розрахунку 0,025 мл на 1 мл розчину агарози і проводять імуноелектрофорез (2 В/см²) впродовж 10 годин. По закінченню пластинки фарбують кумасі синім, сканують, вимірюють площу преципітаційних піків та їх співвідношення.

Відомості, які підтверджують можливість використання способу.

За допомогою запропонованого способу визначали співвідношення фракцій α_1 -кислого глікопротеїну за ступенем розгалуженості N-гліканів при онкогематологічних захворюваннях - істинній поліцитемії, хронічному мієлоїдному лейкозі та хронічному сублейкемічному мієлозі. Результати дослідження (Фіг.2) показали, що у хворих з істинною поліцитемією співвідношення глікоформ α_1 -кислого глікопротеїну практично не змінюється, при хронічному мієлоїдному лейкозі зростає доля фракції В, при хронічному сублейкемічному мієлозі превалює фракція АГП з великою кількістю розгалужених (три-, тетра-антенних, тощо) N-гліканів, на долю якої припадає 53,12±2,25 % від загальної кількості глікопротеїну.

Запропонований спосіб визначення співвідношення глікоформ α_1 -кислого глікопротеїну за ступенем розгалуженості N-гліканів характеризується високою чутливістю, специфічністю, простотою і доступністю реагентів і може бути використаний як в клінічних, так і в науково-дослідних лабораторіях.

Технічний результат, що досягається при використанні винаходу, визначається використанням комбінації моноспецифічних поліклональних антитіл до α_1 -кислого глікопротеїну та лектину Канавалії мечовидної (*Canavalia ensiformis*, ConA) що дозволяє встановити співвідношення фракцій досліджуваного глікопротеїну за кількістю нерозгалужених (двоантенних) та розгалужених (три-, тетра-антенних, тощо) N-гліканів, значно підвищити специфічність аналізу в порівнянні із запропонованими раніше способами.

Розроблений спосіб відповідає умові "промислової придатності", що дозволяє кваліфікувати його як "винахід", який може бути використаний у лабораторній діагностиці онкогематологічних захворювань.

Перелік фігур креслення

Додаток 1

Фіг.1. Перехресний афінний імуноелектрофорез α_1 -кислого глікопротеїну сироватки крові здорових донорів.

Додаток 2

Фіг.2. Співвідношення фракцій α_1 -кислого глікопротеїну за ступенем розгалуженості N-гліканів при проліферативних захворюваннях крові.

Джерела інформації:

1. Пат. №2062471, Российская Федерация, МПК G01 № 33/68. Способ дифференциальной диагностики сублейкемического миелоза и истинной полицитемии/ С.А. Гусева, (Украина). - № 5034684/14 Заявл. 27.03.1992; Оpubл. 20.06.1996.

2. Пат. №45136А, Україна, МПК G01 № 33/68. Спосіб диференціальної діагностики еритроцитемічної стадії сублейкемічного мієлозу і еритремії / С.А. Гусева, О.В. Скрипеч, О.В. Курмишов, Т.Г. Волкова (Україна). - № 2001053624; Заявл. 29.05.2001; Оpubл. 15.03.2002. - Бюл. № 3. - 2 с.

3. Bock O., Lehmann U., Kreipe H. Quantitative intra-individual monitoring of BCR-ABL transcript levels in archival bone marrow trephines of patients with chronic myeloid leukemia. J. Mol. Diagn. 2003 Feb;5(1): p. 54-60.

4. Nowicka J., Nahaczewska W., Owczarek H., Wozniak M. The decrease in prolidase activity in myeloproliferative neoplasms. Adv. Clin. Exp. Med. 2012 Nov-Dec; 21(6):p. 767-771.

5. Myara I., Myara A., Mangeot M., Fabre M., Charpentier Ch., Lemonnier A. Plasma prolidase activity: a possible index of collagen catabolism in chronic liver disease. Clin. Chem. 1984, 30, p. 211-215.

6. Myara I., Marcon P., Lemonnier A. Determination of prolinase activity in plasma. Application to liver disease and its relation with prolidase activity. Clin Biochem 1985, 18, p. 220-223.

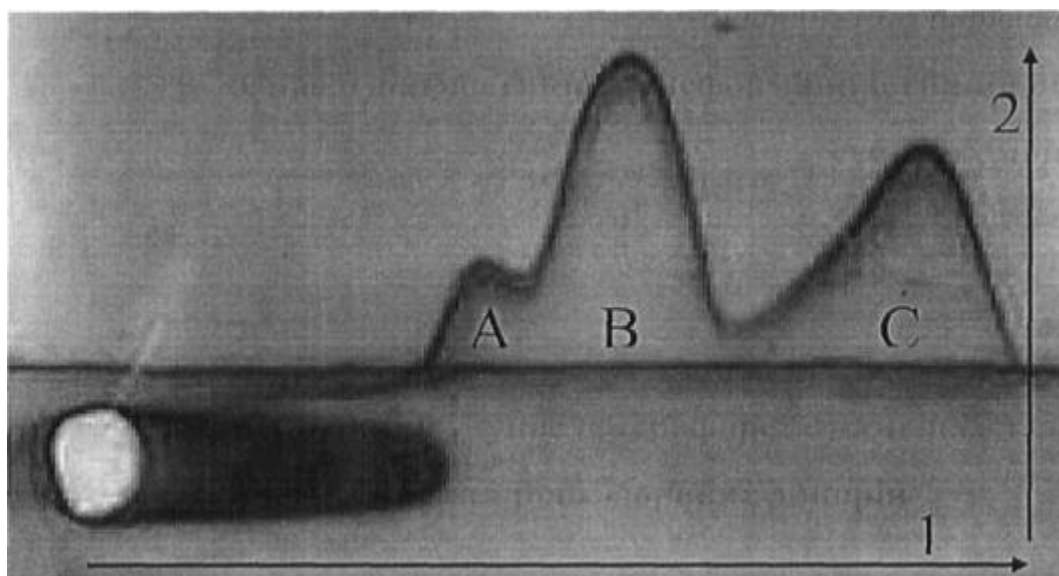
7. Prokop D.J., Kivirikko K.I. Relationship of hydroxyproline excretion in urine to collagen metabolism. Ann. Intern. Med. 1967, 66, p. 1243-1266.

8. Антонюк В.О. Лектини. - Львів: Кварт, 2005. - 550 с.

9. Halsall H.B., Austin R.C., Dage H., et al. Structural aspects of alpha-1-acid glycoprotein and its interactions. In: Otagari M, Sugiyama Y, Testa B, Tillement J-P, eds. Proc. Intern. Symp. Serum Albumin and Alpha-1-acid Glycoprotein: From basic science to clinical applications. Kumamoto, Japan, 2000: p.45-54.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 Спосіб діагностики трансформації істинної поліцитеїї у сублейкемічний мієлоз у онкогематологічних хворих, що включає приготування агарозного гелю, внесення зразків плазми крові у розведенні 1:50 до лунок, з подальшим проведенням перехресного афінного імуноелектрофорезу у двох взаємоперпендикулярних напрямках проти лектину Канавалії мечовидної (*Canavalia ensiformis*), а потім проти моноспецифічних поліклональних антитіл до α_1 -кислого глікопротеїну, з подальшим вимірюванням площі преципітаційних піків, що дозволяє
- 10 встановити співвідношення фракцій α_1 -кислого глікопротеїну з різною кількістю біогенних N-гліканів, який **відрізняється** тим, що розраховують співвідношення фракцій α_1 -кислого глікопротеїну за наявності біантенних N-гліканів, при збільшенні фракції α_1 -кислого глікопротеїну, що не містить біантенних N-гліканів більше 50 % діагностують сублейкемічний мієлоз.



Фіг. 1

За ступенем зв'язування з лектином Канавалії мечовидної (*Canavalia ensiformis*, ConA) на фореграмі виявлено три піки α_1 -кислого глікопротеїну: перша фракція (A) містить тільки біантенні N-глікани, друга фракція (B) містить незначну кількість біантенних N-гліканів, третя фракція (C) не містить двоантенних N-гліканів.

1 - імуноелектрофорез у першому напрямку проти лектину Канавалії мечовидної (*Canavalia ensiformis*, ConA) (10 В/см², 1 година);

2 - імуноелектрофорез у другому напрямку проти моноспецифічних поліклональних антитіл до α_1 -кислого глікопротеїну (2 В/см², 10 годин).

Співвідношення фракцій α_1 -кислого глікопротеїну за ступенем розгалуженості N-гліканів при проліферативних захворюваннях крові

	Фракція А (%)	Фракція В (%)	Фракція С (%)
норма	8,15±0,38	49,32±0,77	42,54±0,98
істинна поліцитемія	7,48±1,29	46,39±1,09	46,83±2,13*
хронічний мієлоїдний лейкоз	6,04±1,38*	54,14±1,78** ^{##}	40,63±2,92 [#]
хронічний сублейкемічний мієлоз	7,61±1,97	40,58±2,83* [#]	53,12±2,25** [#]

Фіг. 2

Фракція А - містить тільки біантенні N-глікани; фракція В - містить незначну кількість біантенних N-гліканів; фракція С - не містить двоантенних N-гліканів.

Достовірна різниця у порівнянні з показниками контрольної групи: **-(p<0,01), *-(p<0,05). Достовірна різниця у порівнянні з показниками групи хворих з істинною поліцитемією: -^{##} - (p<0,01), [#] - (p<0,05).

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601